

牛白血病ウイルス感染に対する
黒毛和種子牛における初乳中抗体と乳汁感
染防除に関する研究

2022年3月

岩手大学大学院 獣医学研究科

富田 啓介

目 次

略語一覧	i
緒 言	1
第一章	
初乳と初乳製剤を給与された黒毛和種子牛の牛白血病ウイルス (BLV) 抗体と プロウイルス量の推移	12
序 論	13
材料および方法	15
1. 供試血液	15
2. ELISA による BLV 抗体検査	16
3. 定量 (qPCR) によるプロウイルス DNA の検出	16
結 果	18
考 察	20
小 括	23

第二章

牛乳中の牛白血病ウイルス不活性化に対する農場での高温保持短時間殺菌の有効性についての研究	24
序 論	25
材料および方法	27
1. 供試血液および末梢血単核細胞 (PBMC) の分離	27
2. BLV 感染単核細胞 (PBMC) を含む 乳汁の高温短時間加温 (HTST) 処理	27
3. 対照のための低温加温処理	28
4. 羊への接種試験	29
5. qPCR によるプロウイルス DNA の検出と ELISA による BLV 抗体検査	29
結 果	31
考 察	32
小 括	34
総 括	35
謝 辞	37

引用文献·····38

图 表·····47

緒 言

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

牛白血病ウイルス (BLV) は、レトロウイルス科デルタレトロウイルス属のプラス鎖 RNA ウィルスで、正 20 面体、粒子の大きさは直径 100~120 nm でエンベロープを有し、ヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV) 1 型および 2 型に近縁である [Stoye et al., 2011]。

BLV の遺伝子構造の模式図を示す (図 0-1)。BLV 粒子には 30-40S RNA が二量体含まれており、ゲノム RNA は有核細胞の mRNA の特徴を有し、RNA 分子の 5'端でキャップ構造をとり、3'端で poly(A) 構造をとる。BLV 遺伝子はウィルス増殖に必須な 3 種の遺伝子 (gag, pol および env) を持つが、マウス肉腫ウィルスのような発ガン遺伝子は持たない [Ketmann et al., 1994]。gag 遺伝子はウィルス粒子を構成するコアタンパク質を、pol 遺伝子は逆転写酵素を、また、env 遺伝子はウィルス外被タンパク質をそれぞれコードする。BLV が細胞に感染すると逆転写酵素の作用で RNA からウィルス DNA が作られる。DNA 合成は RNA の 5' 端近くに結合したトランスファー RNA (tRNA) をプライマーとして開始され、まずマイナス鎖の DNA が合成され、引き続きこのマイナス鎖 DNA を鋳型としてプラス鎖 DNA が合成され、結果として直鎖状の 2 本鎖 DNA が作られる。新しく合成されたウィルス DNA の末端には末端反復配列 (LTR) と呼ばれる塩基配列があり、この領域の R 領域で DNA 合成が止まる。直鎖状の 2 本鎖 DNA は、環状構造を経て宿主 DNA に組み込まれプロウィルスとなり終生持続感染する [Kashmiri et al., 1983]。

BLV 遺伝子がコードするタンパク質を模式的に示す (図 0-2)。gag 遺伝子産物として、まず分子量 70,000 と 45,000 の前駆体タンパク質 (Pr66^{gag} および Pr44

24 gag) が作られ、プロテアーゼの作用で切断されて p10, p12, p15 および p24 が生
25 成される [Bruck et al., 1984, Yoshinaka and Oroszlan, 1985]。これらの gag 遺
26 伝子産物は BLV 感染牛の獲得免疫を誘導し、自然感染牛では gag タンパク質の
27 p12, p15 および p24 のいずれのタンパク質に対する抗体も検出されているが、
28 このうち p24 に対する抗体が量的に最も多く、p24 は感染牛に対し強い免疫原
29 性を示す [Deshayes et al., 1980]。

30 env 領域がコードするタンパク質については、まず前駆体タンパク質 gPr72
31 が合成され、それが分断されて gp51 と gp30 となる。gp51 は BLV の主要タン
32 パク質であり、BLV 感染牛で抗体場性のものでは、上記の p24 抗体が検出され
33 なくても gp51 抗体が検出されることが多い。gp51 抗体は中和活性 [Onuma et
34 al., 1977]を示す一方、補体存在下では細胞障害活性を示し、病態の抑制と促進
35 の 2 面性を有する [Honma et al., 1980]。感染動物血清中の gp51 抗体は、p24 抗
36 体とともにゲル内沈降試験および ELISA の標的抗体として診断的意義が高い。

37 BLV は、牛伝染性リンパ腫 (EBL)の原因ウイルスである [Ketmann et al.,
38 1994, OIE, 2018]。感染牛の約 30%が持続性リンパ球増多症 (PL)となり、その
39 0.1~5%が BLV 感染後 3-4 年あるいはそれ以上経過して、EBL を発症する
40 [Ketmann et al., 1994, OIE, 2018, Tsutsui et al., 2016]。主として成牛にみられ
41 ることから、EBL は成牛型白血病とも呼ばれている。BLV 感染牛は上記のよう
42 に数種の抗 BLV 抗体を産生するが、生涯にわたって発病することなくウイルス
43 を持ち続けるものも多い [Ketmann et al., 1994]。BLV 感染牛は抗体陽性牛とな
44 っても感染が持続するため、ウイルス感染源として血液、乳汁等からウイルス
45 を排出し、次第に他の非感染牛に感染を広げていくことになる。発病率は母集
46 団によりまちまちで、胎児期を含めて早い時期に感染したもののほど PL に進展

47 する可能性が高く、発病に至る期間が短い[Agresti et al., 1993]。病理学的には
48 リンパ節をはじめ、脾臓、心臓、消化管、泌尿生殖器、筋内など全身にリンパ
49 腫病巣がみられ、腫瘍細胞は分子免疫学的解析により B リンパ球由来細胞と考
50 えられている[Ketmann et al., 1994]。

51 我が国では、1927年に岩手県で初めて発生が報告されて以来、全国で発生が
52 認められる。牛白血病 (BL)は1997年まで届出の義務が無かったため、全国的
53 な発生状況を集約することは出来なかった。しかし、本病蔓延による経済損失
54 を危惧する観点から、1998年の家畜伝染病予防法の改正により届出が義務づけ
55 られ、行政機関において発生状況が収集された結果、届出頭数の近年の急激な
56 増加が明らかになっている。本疾病は2020年7月に家畜伝染病予防法の改定に
57 伴い牛白血病から牛伝染性リンパ腫 (EBL)と名称が変更された。報告された
58 BLの年間発生件数は1998年にはわずか99頭、2004年度までは500頭以下
59 で推移していたが、2008年度に1,040頭、2012年度に2,090頭、2020年度は
60 4,197頭に急速に増加した(図0-3)[MAFF, 2020]。BLは2つの異なる臨床症
61 候群、すなわちEBLと散発性牛リンパ腫(SBL)に分類され、SBLは1%未満
62 でBLV感染とは無関係に発生するが、日本でのBLの流行の約99%はEBLと
63 考えられる[Kobayashi et al., 2016, Oliver-Espinosa et al., 1994]。また、食肉
64 衛生検査所においても、BLの発生数の増加と相まって、牛腫瘍性疾患と診断さ
65 れ全廃棄される牛の頭数は2004年以降に急増している[東京都芝浦食肉衛生
66 検査所, 2009, 農林水産省消費安全局畜水産安全管理課, 2009]。

67 1980年代に農林水産省家畜衛生試験場が中心となり初めて行われた全国規模
68 のBLV抗体調査では、抗体陽性率は1980年および1982年にそれぞれ乳牛で
69 3.7%および4.2%、肉牛では7.4%および6.0%であった[伊藤全, 1987]。当時、

70 全国的な発生の報告はわずかであったものの、東北地方では BL の発生が多く
71 報告されており、この調査で 60%を超える高い抗体陽性率が確認される地区が
72 あるなど、BLV の感染と BL 発生の関連が強く示唆されている。

73 2007 年に農林水産省委託事業により、東北、関東、中部、中国、九州の計 7
74 県、約 200 農場の協力を得て、6 ヶ月齢以上の乳用牛約 4,000 頭、肉用牛約 1,400
75 頭を対象に BLV の抗体調査が行われた。その結果、平均抗体陽性率は 28%、
76 そのうち乳用牛は 35%、肉用牛は 12%(うち肉用繁殖牛 15%、肥育牛 8%)であ
77 った [Murakami et al., 2011]。この結果は 1982 年に実施された全国調査の結果
78 に比較して明らかに高い抗体陽性率であった。また、1 歳未満の抗体陽性率は肉
79 用牛が数%であったのに対し、乳用牛では約 16%と高く、抗体陽性率の違いは飼
80 養管理方法の違いと考えられ、BLV 感染母牛の初乳をプールして子牛に哺乳
81 することによる母子感染などの垂直感染が最も重要な要因と推測されている。一
82 方、乳用牛、肉用牛ともに加齢による抗体陽性率の上昇が認められたことから、
83 農場内において水平感染要因が絶えず存在することも示唆されている。

84 本調査を基に、農林水産省の協力の下 2009~2010 年に約 30 年ぶりに BLV
85 全国サーベランス調査が実施された [Murakami et al., 2013]。本調査では抗体
86 調査に加えて、農場の疫学情報をも合わせて入手し、抗体上昇に関係する農場
87 の飼養状況も調査された。個体情報を精査し、移行抗体が消失する 6 ヶ月齢以
88 上の乳用牛 11,113 頭、肉用繁殖牛 9,722 頭を分析に用いたところ、全国の平均
89 感染率は乳用牛で約 40%、肉用牛で約 28%であることが明らかになった。この
90 結果は 1980~1982 年に実施された全国調査の結果 [伊藤全, 1987] に比較して明
91 らかに高い感染率であった。また、乳用牛、肉用牛ともに北海道の抗体陽性率が
92 最も低く、日本列島を南に行くほど感染率が高くなるという地域差が認められ

93 た。興味深いことに、乳用牛、肉用繁殖牛ともに1歳未満で既に約10%に感染
94 がみられ、さらに年齢とともに抗体陽性率の上昇が認められた。乳用牛、肉用繁
95 殖牛ともに年齢に従って感染牛が増えている状況から、農場内で水平感染が絶
96 えず起こっていると推定されるとともに、感染の起点となる1歳未満の感染を
97 抑えることで農場感染率を下げうることを示唆している。子牛のうちに感染す
98 るほど早くEBLが発症することは疫学的に明らかであることから[Agresti et al.,
99 1993]、現在、食肉処理場において牛白血病として摘発される3歳未満の牛は、
100 分娩時や生後早い時期に、感染母牛または感染同居牛から垂直または水平感染
101 したものが多いのではないかと考えられる。感染母牛より生まれた感染子牛が
102 農場内で感染を広げる可能性があることから、感染牛から生まれた子牛は分娩
103 後速やかに検査することがBLV対策上重要である。

104 海外では、EBLの発生は当初北欧に限局していたが、品種改良等のため牛の
105 国際的な移動が活発に行われるに従い、特にEBLは世界各国で報告されるよう
106 になった。欧州のEBLの多発地帯では、1978~1980年の間にBLV抗体陽性
107 率は10~20%に達していたが、その後、欧州のいくつかの国では1970年代の
108 後半から血清反応を主軸とする感染牛の淘汰を含む行政的な防疫体制がとられ、
109 BL発症牛はもとよりBLV感染牛も激減している。現在では、こうした清浄化
110 対策が実を結び、デンマーク(1991年)、フィンランド(1997年)、イギリス(1999
111 年)、スウェーデン(2001年)がEBLの清浄化を宣言するに至っている
112 [DanieIsson, 2003, Nuotio et al., 2003]。以下に各国の検査体制の強化を列記す
113 る。

114 デンマークでは[Salman et al., 2003]、1959年から、EBL発症牛が確認され
115 た農場では全頭血液検査(白血球数と異型リンパ球を検査しBendixenの鍵によ

116 り診断)を実施し、陽性牛は国家補償により淘汰された。1969年からは全国規模
117 の血液検査を実施し、1979年からは寒天ゲル内沈降反応による血清検査を導入、
118 した。1982年からはこの血清検査による全国調査の他、24カ月以上のと畜牛の
119 1/6の検査により抗体陽性牛が検出されると、その農場の24カ月以上の牛を全
120 頭検査とする行政処置が実施された。1989年からはバルク乳を用いたELISA検
121 査も追加された。これらの継続した検査・淘汰により1991年にBLV清浄化が
122 成し遂げられた。

123 スウェーデンでは1990年より清浄化対策が実施された [DanieIsson, 2003]。
124 その内容は12カ月以上の牛は可能な限りEBL防疫プログラムに参加して抗体
125 検査を受け、BLV感染牛は殺処分され、その農場は2度続けて全頭陰性の場合、
126 BLV清浄化農場と認定された。この方法により、1990年以降全国6,000農場の
127 約55,000頭の牛が殺処分され、2001年1月にBLV清浄化が成し遂げられた。

128 フィンランドでは、摘発・淘汰を基本とする清浄化対策がとられた [Nuotio et
129 al., 2003]。1970年からは食肉検査場におけると畜検査と血液検査により発症牛
130 をモニターし、1978年からは血清学的検査も導入した。1990～2001年には、
131 乳用牛はELISAを用いたバルク乳検査、肉用牛はと畜場で1頭ごとに血清を調
132 べる方法で全国調査が行われた。この間の陽性率は最高でも0.03%で、フィン
133 ランド本島では1996年に、離島地域では1999年以降、陽性牛が摘発されなく
134 かった。

135 米国では公式BLV監視プログラムがなく、国内流行を推定することが難しい
136 状態であった。1996年に、全米家畜衛生モニタリングシステム(NAHMS)で、
137 20州内の79%の酪農場を対象にBLVの調査を行ったところ、89%の酪農場で
138 BLV感染牛が存在し、乳用牛の44%に感染がみられた [National Animal Health

139 Monitoring System, 1997]。1998 年には 23 州で 2,713 戸の肉用牛農場について
140 調査が行われ、38%の農場において BLV 感染牛が 1 頭以上存在し、抗体陽性率
141 は 25%未満であるものの検査農場の 56%で陽性牛が検出されていた [National
142 Animal Health Monitoring System, 1999]。近年の全米酪農場調査では、1 頭以
143 上の BLV 抗体陽性牛が摘発される農場は 94.2%、農場の平均感染率は 46.5%と
144 上昇している [LaDronka et al., 2018]。

145 他の主要な畜産国の感染状況については、カナダでは乳用牛の 60.8%、肉用
146 牛の 10.3% [VanLeeuwen et al., 2006]に感染がみられ、アルゼンチンでは乳
147 用牛の 32.85%に感染がみられ、牛群感染率は 84% [Trono et al., 2001]と報告さ
148 れている。

149 近年、アジア、アフリカならびに南米北部等においても、BLV サーベランス
150 が実施され、感染状況が報告されるようになった。中国では 6 州の調査におい
151 て、乳用牛で 49.1%、肉用牛で 1.6% (2016 年) [Yang et al., 2016]、トルコでは
152 乳用牛で 2.3% (2015 年) [Şevik et al., 2015]、イランでは乳用牛で 41.3% (2012
153 年) [Haghparast et al., 2012]、モンゴルでは 3.9% (2016 年) [Ochirkhuu et al.,
154 2016]、フィリピンでは 9.7% (2015 年) [Polat et al., 2015]、エジプトでは乳用
155 牛で 21.5% (2020 年) [Hamada et al., 2020]、南アフリカでは 12.6% (2011 年)
156 [Ndou et al., 2011]、コロンビアでは 62% (2020 年) [Corredor-Figueroa et al.,
157 2020]とそれぞれ感染率が報告されている。

158 BLV は、感染動物由来の感染細胞が非感染動物の体内への移入することによ
159 り水平および垂直伝播する [Rodríguez et al., 2011]。現在までに多くの感染ル
160 ートが報告されているが、主な伝播様式は Cell to cell 感染であることより、感
161 染防止には感染牛の血液中の白血球の不活化が重要である。水平感染として、

162 医療機器や除角器具などを介した人為感染（医原性感染）、アブなどの吸血昆虫
163 を介した自然感染、牛同士の体液を介した接触感染などがあり、BLV 伝播を防
164 ぐためには、注射針の 1 頭 1 針使用の原則、手術器具等の消毒、直腸検査の手
165 袋を 1 頭毎に交換するなど、観血的な処置での衛生管理を徹底することが基本
166 となる。また、山地放牧の場合には陽性牛と陰性牛を別々の放牧地で放牧し、吸
167 血昆虫の防除に努めることも大切である。垂直感染として、周産期の子宮内・産
168 道感染、出生後の初乳と牛乳を介した感染 [Hopkins and DiGiacomo, 1997] が
169 あげられる。子宮内の BLV 伝達率は、4~18%と報告により様々であるで {Piper,
170 1979 #238}{Ferrer, 1976 #115}[Lassauzet et al., 1991]。子宮内感染では、PL 牛
171 から生まれた子牛の発症リスクが高いことが知られている [Agresti et al.,
172 1993]。

173 我が国の全国調査において BLV 感染のリスク要因を解析したところ、「外部
174 からの牛の導入」、「公共牧場への預託」、「農場にアブなどの吸血昆虫が多く存
175 在すること」、「フリーストール・フリーバーンなどつなぎ飼いでない農場」、「子
176 牛と成牛の接触が容易である環境」などが推定された [Kobayashi et al., 2014]。
177 したがって、我が国において BLV の感染を拡大させないため、さらには EBL の
178 発症を減少させるためには、これらに注力した対策が重要である。また、EBL
179 発症のあった農場では、BLV 感染牛が多い傾向にあることより [Kobayashi et
180 al., 2014], 1 頭でも牛白血病が発症した農場は全頭検査を行い、早期に対策を
181 実施する必要がある。アブなどの吸血昆虫が存在するというリスクを最優先に
182 考え、実験的に牛舎の入り口、窓を防虫ネットで被うことでアブが容易に出入
183 りできないようにしたところ、牛舎内のウイルス感染を抑えることが出来たと
184 いう報告もある [松崎駿ら, 2019]。

185 BLV 感染母牛からは出産させないことも重要である。やむを得ず感染牛から
186 出産させる場合は、子宮内感染があることを念頭に置き、分娩後は必ず新生牛
187 の検査を行い、BLV 感染の有無を確認することが重要である。

188 高度に BLV 感染がみられる乳用牛では、血液中に大量の BLV 感染細胞を保
189 有しているため、乳汁中にも BLV 感染細胞が含まれている [Michishita et al.,
190 2011]。このため、乳汁も感染要因の一つに考えられている [Ferrer and Piper,
191 1981]。しかし、BLV 感染牛の初乳中には、BLV 感染細胞と同時に高力価の抗
192 BLV 抗体が含まれているため、通常では感染伝播は起こりにくいとされている
193 [Lassauzet et al., 1989, Nagy et al., 2007, Van Der Maaten et al., 1981]。日本で
194 は 1 歳未満の肉用繁殖牛および乳用牛における BLV 感染率は、それぞれ 14%
195 と 20% である [Murakami et al., 2013]。また、BLV 感染牛の初乳や常乳を介
196 した生後 6~12 ヶ月の子牛への BLV の感染率は、乳用牛群では約 6~16% と報
197 告されている [Hopkins and DiGiacomo, 1997, Ruiz et al., 2018]。これらのこと
198 から、乳汁感染も十分に配慮しなければならない感染ルートと考えられる。ま
199 た、興味深い知見として、BLV 感染母牛から直接初乳を飲んだ子牛は BLV 感染
200 率が低いが、プールされた初乳を給与された子牛に BLV 感染率が高い傾向が認
201 められている [Kobayashi et al., 2014]。つまり、BLV 感染母牛が存在する農
202 場では、プールされた初乳の BLV 不活化処理、または加工処理された初乳製剤
203 の給与が望まれる。これより、初乳および常乳感染を防除するには、飼養形態
204 の違いにより、以下の対策が肝要になる。乳用牛では、初乳摂取後すぐに代用
205 乳・人工乳に切り替えることより、初乳中に含まれる BLV を不活化することが
206 肝要である。一方、肉用牛においては、初乳摂取後も母子が同居し、数か月間移
207 行抗体の少ない母牛の常乳を摂取することとなるので、早期の母子分離が肝要

208 である。

209 近年、我が国の畜産農家数は減少傾向にある一方、畜産農家1戸あたりの飼
210 養頭数は、肉用繁殖雌牛では2013年度11.7頭から2021年度17.1頭、乳用
211 牛経産牛では、2013年度47.6頭から2021年度61.1頭と大規模化が進展して
212 いる。さらに、分娩間隔の短縮や子牛の事故率低減、労働負担の軽減を図るた
213 め情報通信技術（ICT）等の新技術を活用した発情発見装置や分娩監視装置、哺
214 乳ロボット等の機械装置の導入が進んでいる〔農林水産省生産局畜産部、2021〕。
215 しかし、BLV感染母牛由来の不活化不十分な初乳・乳汁の供用、哺乳ロボット
216 等牛同士の体液を介した接触を伴う機器の安易な利用はBLV汚染農場におい
217 て子牛にBLVが広がる重大な危険因子になりうる可能性があるので注意が必
218 要であろう〔Hopkins and DiGiacomo, 1997, Kobayashi et al., 2010〕。子牛への
219 乳汁給与においては、凍結・融解または加温（非働化：55℃ 30分）した初乳中
220 のウイルス感染細胞は、温度または細胞への物理的要因により破壊されるた
221 めウイルスは不活化され、その感染力は消失すると考えられている。凍結・融
222 解処理がBLVの不活化に有効であるかについて動物試験を行いその事実が正
223 しいことが再確認されているが〔Kanno et al., 2014〕、加温の効果については
224 1970年代の試験報告しかない〔Baumgartener et al., 1976〕。さらに、近年我が
225 国の飼養頭数の増加に伴い農場に導入されつつある農場オンサイト型の大型
226 高温短時間殺菌（HTLT）装置の効果は確かめられていない。

227 本研究では、日本の畜産業において重要な位置を占める黒毛和種牛における
228 BLV感染母牛から子牛への感染防除に資することを目的に研究を行った。第一
229 章では、黒毛和種牛特有の分娩後母子同居という飼養形態において、初乳給与
230 後においても常乳感染の防除が可能な母子分離時期推定のため、初乳および初

231 乳製剤を給与された黒毛和種子牛の BLV 抗体ならびプロウイルス量について
232 調査した。また、第二章で、乳汁中に存在する BLV 感染細胞の加温による不活
233 化効果について、農場オンサイト型大型高温短時間殺菌（HTLT）装置の有効性
234 について検討した。

235

236

237

238

第一章

239

240

初乳と初乳製剤を給与された黒毛和種子牛の牛白血病ウイルス

241

(BLV) 抗体とプロウイルス量の推移

242

序 論

243

244

245 BLV は、感染牛由来の感染細胞が非感染牛に移入されることにより水平およ
246 び垂直感染する [Rodríguez et al., 2011] (表 1-1)。

247 水平感染として、牛同士の体液を介した接触感染、アブなどの吸血昆虫を介
248 した自然感染、医療機器や除角器具などを介した人為感染があげられる。

249 一方、垂直感染として、周産期の子宮内・産道感染、出生後の初乳および常
250 乳を介した感染 [Hopkins and DiGiacomo, 1997]があげられる。感染牛からの
251 子宮内感染率は 4~18%と報告されており [Lassauzet et al., 1991, Piper et al.,
252 1979], 発症前の PL 牛から生まれた子牛の感染リスクは高いとされている
253 [Agresti et al., 1993]。

254 血液中に BLV プロウイルスが多い BLV 感染母牛は、BLV に感染した白血球
255 を乳汁中に排泄することが知られている [Michishita et al., 2011]。そのため、
256 6~12 ヶ月齢までの子牛において、感染母牛の初乳および常乳を介した BLV 感
257 染率は約 6~16%と報告されている [Hopkins and DiGiacomo, 1997, Ruiz et al.,
258 2018]。重要な点として、初乳および常乳には BLV プロウイルス DNA の存在
259 にかかわらず、BLV に特異的な移行抗体が含まれるため、それらを摂取した子
260 牛感染が成立しないこともあるとの報告がある [Konishi et al., 2018, Lassauzet
261 et al., 1989, Nagy et al., 2007, Van Der Maaten et al., 1981]。

262 我が国では、2009 年~2010 年の全国サーベランス調査での全国の平均感染
263 率は乳用牛で約 40%, 肉用牛で約 28%となっており [Murakami et al., 2013], そ
264 の感染率の高さから感染牛の一斉淘汰は困難と考えられる。

265 乳用牛の多くは分娩後すぐに母子分離飼育されるが、黒毛和種では 3~6 カ

266 月程度母子同居飼育することが一般的であり（表 1-2）、母子の接触感染や、夏
267 季には吸血昆虫を介した BLV 感染が生じる可能性がある [Hopkins and
268 DiGiacomo, 1997, Ooshiro et al., 2013]。また、BLV 感染母牛の初乳は移行抗
269 体が大量に含まれ種々疾病の感染防御に役立つが [Konishi et al., 2018]、移行
270 抗体消失後の常乳は BLV 感染源となり得る。しかし、BLV 感染母牛と同居し
271 ている場合、初乳摂取後の子牛がどのくらい感染するかは不明であり、子牛の
272 早期母子分離が必要と考えられる。

273 本章では、BLV 感染および未感染母牛から生まれた子牛の血中 BLV プロウ
274 イルス量と BLV 移行抗体を調査し、黒毛和種子牛からの BLV 感染を予防する
275 ための効果的な早期母子分離プログラムに寄与するためのデータを収集した。

276

277

材料および方法

278

279

280 1) 供試血液

281

282 本研究は、兵庫県における EBL 撲滅プログラムへの自主的参加に基づいてお
283 り、主任研究者が主旨を説明、農場主から参加の同意を得て実施した。

284 垂直感染に関するより正確な結果を得ることを目的とし、研究期間として、
285 2018 年 10 月から 2019 年 5 月にかけて、兵庫県の黒毛和種飼養農場で吸血昆虫
286 が見られない時期を設定した。この農場では、子牛は出生後 2 時間以内に、初乳
287 および（または）初乳製剤 500 ml（粉末 225g に IgG 60 g 含む）（Head start;
288 Bayer Co. Ltd., Tokyo, Japan）を給与し、約 3 か月齢で母子分離していた。な
289 お、本初乳製剤は、IgG の吸収に必要なカゼインタンパクと乳脂肪、免疫グロブ
290 リンを主成分としたホエイを含む初乳の全脂粉乳であり、製造工程で加熱乾燥
291 処理が施されている。処理工程で BLV は不活化されると考えられるが、BLV 抗
292 体が含まれるか否はロットにより差があると考えられる。

293 子牛は次の 4 グループ(G1~4)に分け、G1 は ELISA 陰性/qPCR 陰性(ELISA-
294 /qPCR-)母牛から生まれ、初乳のみを摂取した子牛 2 頭、G2 は ELISA-/qPCR-
295 母牛から生まれ、初乳と初乳製剤の両方を摂取した子牛 3 頭、 G3 は ELISA 陽
296 性/qPCR 陰性(ELISA+/qPCR-)母牛から生まれ、初乳と初乳製剤の両方を摂取
297 した子牛 2 頭、G4 は ELISA 陽性/qPCR 陽性(ELISA+/qPCR+)母牛から生まれ、
298 初乳と初乳製剤の両方を摂取した子牛 3 頭である。

299 BLV 感染状況を確認するため、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)加および
300 EDTA 無の採血管にて、母牛の血液サンプルは、分娩前後 2 週間以内に、子牛の

301 血液サンプルは、1～14 日齢、15～29 日齢、30～59 日齢、60～79 日齢、80～105
302 日齢および 165 日齢以上で頸静脈から採取した。子牛の各サンプリング段階は
303 それぞれステージ 1, 2, 3, 4, 5 および 6 と定義した（表 1 -3）。

304 BLV 遺伝子検査は定量 PCR (qPCR), BLV 抗体検査は ELISA 法にて実施し
305 た。

306

307 2) ELISA による BLV 抗体検査

308

309 BLV 抗体検査は血液を遠心分離(1,500 g, 10 min)して、得られた血清につい
310 て市販の ELISA キット (BLV ELISA tests, JNC, Tokyo, Japan)を用い実施した。
311 定性試験として抗体の陰陽性を判定するとともに、定量試験として Konishi ら
312 [Konishi et al., 2018]のシンシチウムアッセイの抗体価を参考に、血清を×4,
313 ×16, ×64, ×256, ×1,028 の 6 段階希釈し、定性試験と同様に SP 値が陽性と
314 判定された最大希釈倍率をみなし抗体価とした。

315

316 3) qPCR によるプロウイルスの定量

317

318 2ml の EDTA 処理血液に 0.83%の塩化アンモニウムを 4ml 添加して溶血させ
319 た血液サンプルを、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で 3 回洗浄し、800 g で 5 分間
320 遠心して白血球を得た。DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen K.K., Tokyo,
321 Japan)を使用して白血球からゲノム DNA を抽出した。抽出した DNA は PCR
322 を実施するまで -20° C で保存した。DNA 濃度は Nano Drop One
323 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)を用いて測定し、

324 滅菌蒸留水で最終濃度 20 ng/ μ l に希釈した。

325 qPCR は, Cycleave PCR Reaction Mix SP と BLV tax 遺伝子領域を対象とする
326 Probe/Primer Mix for BLV (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いて,サイクリング
327 プローブ法により(図 1-1)実施した。qPCR は Thermal Cyclor Dice® Real Time
328 System II TP700 (Takara Bio, Shiga, Japan)で行った。標準曲線は, $10^0\sim 10^5$
329 copies/reaction の標準プラスミド(Takara Bio, Shiga, Japan) の 10 倍の連続希
330 釈を使用して生成した。BLV プロウイルス量を copies/10 ng DNA として表し
331 た。

332

結 果

333

334

335 1) ELISA による BLV 抗体検査および qPCR によるプロウイルス DNA の検 336 出

337

338 対照群(G1 および G2)において、子牛の BLV 抗体は陰性の 2 頭 (G1) , 陽性
339 の 3 頭 (G2) の 2 グループに分けられた。G1 の 2 頭の子牛は、出生からこの研
340 究の終了時まで BLV 抗体陰性であった。G2 の 3 頭の子牛は、初乳および初乳
341 製剤の摂取直後に BLV 抗体陽性反応 (×1, ×16) を示した。その後、それらは
342 ステージ 3 まで陽性 (×1, ×4) であったが、1 頭はステージ 4, 2 頭はステージ
343 6 で BLV 抗体陰性となった (表 1-4)。

344 試験群 (G3 および G4) において、子牛の BLV 抗体は 5 頭 (G3 および G4)
345 全てで初乳および初乳製剤の摂取直後に陽性 (×64, ×256) であった。その後、
346 G3 では抗体価は暫時減少し、ステージ 6 で 1 頭は×1, 1 頭は陰性となった。G4
347 では×4~×256 で変動しながら推移し、ステージ 6 では×64~×256 であった
348 (表 1-4)。

349 対照群(G1 および G2)において、全ての子牛は、出産後から本研究終了まで
350 BLV プロウイルス陰性であった(表 1-4)。

351 試験群 (G3 および G4) において BLV プロウイルスは、G4 の 3 頭の子牛のう
352 ち、2 頭でステージ 1 (出生後 2 週間以内) において検出、1 頭でステージ 5 (85
353 日齢) までは陰性であったが、ステージ 6 (176 日齢) で検出した。検出限界以
354 下の BLV プロウイルスを有する母牛から生まれた G3 の 2 頭の子牛は、この研
355 究を通じて BLV プロウイルスでは未検出であった (表 1-4)。

考 察

356

357

358 対照群(G1 および G2)では、研究期間中に BLV プロウイルスは検出されな
359 ったことから、G2 で検出された BLV 抗体は初乳製剤には各種抗体が含まれて
360 いることより、これに由来したと考えられた [Choudhury et al., 2015]。本試験
361 において初乳製剤を供給された子牛の BLV 抗体は少なくとも 2 ヶ月間継続して
362 おり、この結果は過去の報告 [Choudhury et al., 2013]と一致している。BLV 抗
363 体持続時間は、子牛の健康状態や初乳製剤の摂取量の差に起因すると考えられ
364 る。したがって、ELISA またはアガロースゲル免疫拡散 (AGID) 試験による
365 BLV 抗体診断で検出される抗体は、BLV 抗体を含む初乳由来か、感染抗体かを
366 区別することができない。

367 BLV 抗体陽性/プロウイルス陰性母牛からの産子 (G3) では、BLV 抗体は BLV
368 プロウイルス非検出下で 6 ヶ月間継続した。初乳摂取子牛の IgG の半減期は
369 28.5 日とされており、初乳製剤の半減期 (19.1 日) よりも長いことが明らかと
370 なっている [Murphy et al., 2014]。また、BLV 感染母牛から初乳を与えられた子
371 牛は、BLV 抗体に陽性であり、2~6 ヶ月齢まで保持することが報告されている
372 [Johnson et al., 1987, Ohshima et al., 1984]。したがって、本群における BLV 抗
373 体は、母牛又は初乳製剤の移行抗体由来のものと考えられた。

374 BLV 抗体陽性/プロウイルス陽性母牛からの産子 (G4) では、ステージ 1 の 3
375 頭のうち 2 頭で BLV 感染を確認した。子牛の実験感染による研究では、感染細
376 胞接種 2 週間後に、PCR によって BLV プロウイルスが検出されたとの報告があ
377 ることから [Nagy et al., 2007]、これらの子牛では子宮内感染の可能性が高いと
378 考えられた。

379 BLV 抗体陽性/プロウイルス陰性である G3 母牛が BLV に感染していると仮
380 定すると、G3 および G4 の 5 頭中 2 頭(40%)が子宮内感染と考えられる。この
381 結果は、黒毛和種の感染母牛から生産された子牛の 12.9%が子宮内感染したと
382 いう過去の報告[Mekata et al., 2015] よりも感染率が明らかに高かった。しか
383 し、それらの母牛の BLV プロウイルスの量は、Mekata らの 400copies/10ng 以
384 上で感染リスクが増すとの報告 [Mekata et al., 2015]よりも明らかに低かった。
385 一方、G4 のうち最も高いプロウイルス量を示した母牛からの産子 1 頭は、ステ
386 ージ 1 で BLV プロウイルスが検出されず、生後 6 ヶ月で qPCR 陽性を示した。
387 本実験は吸血昆虫の存在しない時期に実施されているので、この 1 頭は子宮内
388 感染や産道感染ではなく、乳汁感染の可能性が高いと考えられた。本研究では、
389 初乳感染か常乳感染かは明らかにすることはできなかったが、高プロウイルス
390 量を有する母牛は、乳汁中に感染細胞を排出しているリスクが高いことから
391 [Michishita et al., 2011]、その乳汁が感染源となる可能性があるので注意が必要
392 と考えられ、今後、乳汁中の感染細胞の検出をする必要がある。

393 移行抗体は BLV に対して高い中和活性を示し、BLV 感染母牛から初乳を摂取
394 する子牛は、30~100 日前まで BLV 感染を防ぐことができるとされる [Konishi
395 et al., 2018]。一般的に、健康な子牛は約 60 日齢で自身の免疫細胞から抗体を
396 産生することができる [Hulbert and Moisés, 2016]。そのため、移行抗体が自身
397 の抗体産生まで十分に維持されることが、感染防御上重要である。

398 本研究の結果の解釈においては、留意すべき点が 2 つ（いわゆる研究体制に
399 おける weakness）ある。まず、日本の黒毛和種飼育農家は少数の飼養規模であ
400 るため、この研究は小規模で行われたが、正確な結果を示すためには、供試頭数
401 を増やして検証する必要がある。第 2 に、初乳製剤の給与量を確認したが、子牛

402 が実際に摂取した初乳の量を確認することは困難であった。初乳を搾乳し、ペ
403 ットボトル等を使用して一定量を子牛に給与する必要がある。母乳の感染性を
404 調べるには、経時的に母乳を採取し接取試験をするのが最も確実である。本試
405 験では、子牛の経時的採血に加え、感染母牛から母乳の採材を試みたが、十分
406 に採取することはできなかった。泌乳量は、黒毛和種およびホルスタイン種そ
407 れぞれ、分娩直後が $0.25 \pm 0.05\text{kg}$, $4.56 \pm 1.39\text{kg}$, 分娩 5 日目が $2.51 \pm 0.85\text{kg}$,
408 $20.99 \pm 1.07\text{kg}$, 分娩後 6 ヶ月 (26 週) 間の総乳量が $486.0 \pm 97.0\text{kg}$, 4,
409 $859.2 \pm 163.6\text{kg}$ であり [新宮 et al., 2002], 黒毛和種の泌乳量はホルスタイン
410 種の 10%程度と極めて少量である。本研究では子牛の哺乳後に採材を試みたた
411 め、母乳の採取ができなかったことから、子牛の自主的な哺乳を妨げない環
412 境下で採取することが課題として残った。

413 本研究において、BLV 感染および未感染母牛から生まれた子牛の BLV 抗体
414 レベルを調査した。黒毛和種子牛に与えた初乳製剤に含まれる BLV 抗体は 1~
415 3 月齢まで続くこと,が示された。さらに、子宮内感染は BLV 感染母牛のプロウ
416 イルス量が多くなくとも起こりうること、一方、高いプロウイルス量は,乳汁(初
417 乳および常乳)感染に関連している可能性が推察された。これらの結果は、黒毛
418 和種子牛からの BLV 感染を予防するための効果的な早期母子分離プログラム
419 に寄与するための基礎データとなると考えられた。

420

421

小 括

422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438

BLV 感染および未感染母牛から生まれた子牛の BLV 移行抗体おレベルを調査した。子牛の初乳製剤由来と推察される BLV 抗体は 1~3 ヶ月間続いたのに対し、BLV 感染母牛由来の BLV 抗体は 6 ヶ月間続いた。BLV 感染母牛からの産子 5 頭のうち 3 頭が感染していることが判明した。2 頭は子宮内で感染し、1 頭は乳汁を通じて感染したと推定された。

子宮内感染は BLV 感染母牛のプロウイルス量が多くなくとも起こりうること、一方、高いプロウイルス量は、乳汁（初乳および常乳）感染に関連している可能性が推察された。

本研究により、BLV 感染母牛の産子に子宮内感染、母乳感染があることが確認された。抗体消失後の感染母牛からの乳は BLV 感染源となる可能性が高いため、母牛の感染状況を把握し早期に母子分離することが、感染母牛から子牛の感染を守るため大切なことと考えられ、それらの点に留意して黒毛和種子牛からの BLV 感染を予防するための効果的な早期分離プログラムを構築する必要があると考えられた。

1
2
3
4
5
6
7
8
9

第二章

牛乳中の牛白血病ウイルス不活性化に対する農場における高温短時間殺菌の有効性についての研究

序 論

10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

2009～2010 年に実施された全国調査において、日本では、1 歳未満の肉用牛および乳用牛における BLV の発生率はそれぞれ 14%および 20%であった [Murakami et al., 2013]。6～12 ヶ月齢の子牛への感染母牛の初乳および常乳を介した BLV 感染率は、乳用牛群で約 6～16%であり [Hopkins and DiGiacomo, 1997, Ruiz et al., 2018]、血液中に大量の BLV プロウイルスを保有する BLV 高度感染母牛は、BLV 感染した白血球を牛乳中に排出していると報告されている [Michishita et al., 2011]。一方、BLV 感染牛の初乳中には BLV 感染細胞と同時に高力価の抗 BLV 抗体が含まれているため、通常では感染伝播は起こりにくいとされている [Lassauzet et al., 1989, Nagy et al., 2007, Van Der Maaten et al., 1981]。また、BLV 感染母牛から直接初乳を飲んだ子牛は BLV 感染率が低い [Kobayashi et al., 2014]、プールされた初乳を給与された子牛に BLV 感染率の高い傾向が認められており、母牛からの移行抗体の重要性が指摘されている。

さらに、近年の農場の大規模化により集団飼育された子牛に供給するためにプールされた初乳または常乳の自動給餌機が、飼養管理における作業負荷と作業時間を減らすためにしばしば使用されるようになってきている。しかし感染防御策が不十分なままでのこれらの安易な使用は、酪農場の子牛に BLV 感染が広がる重要な危険要素になる可能性がある [Hopkins and DiGiacomo, 1997, Kobayashi et al., 2010]。したがって、子牛に自動給餌する前に、プールされた初乳または乳汁中の BLV を不活性化する方法の開発が急務である。

牛乳の殺菌方法を表 2-1 に示す。様々な系統の牛において数種類の病原体に対する低温殺菌の効果が検討されている。例えば、*Staphylococcus aureus* と

33 *Streptococcus agalactiae* は、初乳を 60° C で 30 分間処理すると減少する
34 [Elizondo-Salazar et al., 2010]。 *Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis*
35 は自然感染した乳が 63° C で 15 分間処理された後は検出されないが、生乳中
36 に十分な数 (10⁵ cfu/ml 以上) 存在すれば高温短時間殺菌 (HTST) であっても
37 生き残ることが明らかとなっている [Gao et al., 2002]。牛乳の加温による BLV
38 の不活性化に関する報告は少なく、現在でも実験室規模の殺菌方法の報告しか
39 ない [Baumgartener et al., 1976, Rubino and Donham, 1984]。農場オンサイト
40 型の乳汁通過型 HTST 機器は、主に殺菌と洗浄工程の自動化により大量の牛乳
41 を一度に処理できるため、近年、規模が拡張している酪農家にとって飼育作業
42 の効率化を図る上で、低温長時間殺菌 (LT LT) に比較しても非常に有用なシス
43 テムとして期待されている。この装置は、一方の管に熱水を、もう一方の管には
44 牛乳を通過させ、熱交換部で管が密着し牛乳を加熱する機能を備えた金属配管
45 システムである。循環乳は、設定温度 (72° C) まで急速に加熱され、15 秒間保
46 持される。本研究では、子牛への自動哺乳前にプールされた初乳または牛乳を
47 想定し、農場での通過型 HTST 装置の BLV の不活性化に対する有効性を腫瘍
48 原性の不活性化により確認するために、BLV に感受性のある唯一の動物である
49 羊のバイオアッセイにより調査した。

50

51

材料および方法

1) 供試血液および末梢血単核細胞 (PBMC) の分離

本研究における動物の使用は、岩手大学動物実験委員会によって承認された。承認番号は No.A201703 である。

BLV 感染血液材料は岩手大学農学部フィールドサイエンスセンター・御明神牧場で飼養管理されている黒毛和種牛 (J19-0147) から採材した。BLV は Cell to cell 感染であるため、末梢血単核細胞 (PBMC) を EDTA 処理した血液を 60% Percoll (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) を PBMC 分離用遠心管 (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany) に入れ、1,000 g の密度勾配遠心分離 (Model 5500, Kubota, Tokyo, Japan) により単離した。トリパンブルー染色し、血球計算盤 (Improved Neubauer, Sunlead Glass, Saitama, Japan) にて、PBMC の数と生存率を算出した。

2) BLV 感染単核細胞 (PBMC) を含む乳汁の高温短時間加温 (HTST) 処理

BLV 感染牛由来 PBMC を用いて加温処理した乳汁材料を調製した。農場において高温短時間加温 (HTST) 試験のために市販の牛乳 13 L (HTST 機器の最小牛乳容量) に、羊腹腔内接種では感染リンパ球数 $7 \times 10^{3 \sim 4}$ 個で 100% 感染が成立することから、 7×10^7 PBMC (6.7×10^7 BLV 感染 PBMC を含む、換算方法は後述) を添加した。調整した乳汁は、通過型大型加温装置 (Kompakt Pasteur, Forster Technik, Engen, Germany) により 72°C で 15 秒 (完全な HTST 処理)

75 (2 検体), または 60°C で 15 秒 (不完全な HTST 処理) (4 検体) の加温処理
76 を行った。対照として, 1.75×10^8 PBMC を含む 13 L の牛乳は, 加熱せずに大型
77 加温装置を通過させた (HTST なし) (4 検体)。交差汚染を防ぐために, それ
78 ぞれの行程を独立して行い, 設備が完全に洗浄サイクルを経たあとに次の加温
79 試験を実施した。

80 加温処理された牛乳 (完全な HTST, 不完全な HTST, および HTST なし) の
81 各ロットは, 同量のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (Takara Bio, Shiga, Japan) を
82 添加し 4°C で 30 分 400 g 遠心分離 (Model 5500, Kubota) し, PBMC を回収し
83 た。羊へ腹腔内接種する (後述) ために, PBMC を市販の牛乳中に再懸濁し, 推
84 定 約 3.5×10^7 または 3.4×10^7 BLV 感染 PBMC/30 ml の投与サンプルを調整
85 した。

86

87 3) 対照のための低温加温処理

88

89 日本の小規模農場では実験室規模の低温加温殺菌 (LTLT) 装置の使用が一般
90 的であるため, 農場オンサイト型大型 HTST 装置試験の比較として, LTLT 装置
91 を使用した。LTLT 試験では各サンプルについて, プラスチック製管に 30 ml の
92 牛乳を入れ, そこに 3.5×10^7 PBMC (3.4×10^7 BLV 感染 PBMC) を加えた。合
93 計 6 個のサンプルを用意した。これらのサンプルのうち 2 個は, 実験室 LTLT
94 加温装置 (MAM12A, Orion Machinery, Nagano, Japan) で 60°C 30 分間,
95 LTLT 処理した。残りのサンプル 4 個は不活化されていない陽性対照 (LTLT な
96 し) とし, 室温で 30 分間保持した。

97 全体の陰性対照として, PBMC を添加しない 30 ml の牛乳サンプルを陰性対
98 照とした。

99 4) 羊への接種試験

100

101 試験は、吸血昆虫であるアブ（BLV の主なベクター）がほぼ見られない 2018
102 年 10 月から 2019 年 2 月にかけて行った。バイオアッセイには、5~42 月齢の
103 コリデール種及びサフォーク種 16 頭の羊を使用した（表 2-2）。実験開始時に、
104 すべての羊について、qPCR および ELISA によって BLV プロウイルスおよび
105 BLV 抗体の有無を検査した。牛乳サンプルを、以前に報告されたように各羊の
106 腹腔内に接種 [Baumgartener et al., 1976, Kanno et al., 2014]、羊の観察を毎日
107 行い、17 週間まで週に 1 回頸静脈から採血した。羊は区分管理により同居感染
108 を防止したうえで、飼養管理場所には自動給水装置を装備し、朝と夕方に 1 日 2
109 回乾草を与えた。

110

111 5) qPCR によるプロウイルス DNA の検出と ELISA による BLV 抗体検査

112

113 二重 qPCR は、BLV tax 遺伝子領域を標的とし、PBMC における BLV 感染率
114 を算出するためにウシ RNase P 遺伝子を内部標準として、血液中の BLV プロ
115 ウイルス量を測定した。qPCR は 95° C で 20 秒の初期変性後、95°C 1 秒の変性
116 および 60°C 20 秒でアニーリング/伸長から成る 40 増幅サイクルで行った。反
117 応混合物は、5 μ l のテンプレートゲノム DNA、10 μ l のプレミックス Ex Taq
118 (Probe qPCR; Takara Bio, Shiga, Japan)、0.4 μ l の 10 μ M tax フォワードと
119 リバースプライマー (5'-CCATGTGGGGTTACACGTAT-3' および 5'-
120 ACCAATCGGACCAGGGC-3'), 0.3 μ l の 10 μ M RNase P フォワードとリバ
121 ースプライマー (5'-CTACGAGCTGAGGCGCGTGTC-3' および 5'-

122 CCTATGGCCCTAGTCTCAGACCTT-3'), 0.8 μ l の 2.5 μ M FITC ラベル
123 TaqMan MGB プローブ (5'-FAM-CAGTCCCAGGCCTT-MGB-3'), 0.8 μ l の
124 2.5 μ M VIC ラベル TaqMan MGB RnaseP プローブ (5'-VIC-
125 TCTGTGTCCATGTGTGTGTGTCCC-MGB-3' (Life Technologies Japan, Ltd.),
126 0.4 μ l ROX 基準色素 (Takara Bio) からなり, これらに脱イオン水を加え 20 μ l と
127 した。qPCR は, Step One Plus リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems,
128 Life Technologies, Foster City, CA, USA) で実施した。

129 標準曲線は, 10^0 から 10^5 copies/reaction までの標準プラスミドの 10 倍階段
130 希釈を使用して生成した。プロウイルス量は BLV copies/10 ng DNA として表
131 した。PBMC における BLV 感染率は, 次の式を用いて計算した。

132

$$133 \quad \% \text{ BLV 感染細胞} = [\text{BLV tax コピー数} / (\text{RNase P コピー数} / 2)] \times 100$$

134

135 血液中の抗 BLV 抗体は, ELISA (JNC, Tokyo, Japan) を用い, 説明書に従って
136 測定した。

137

138

139

結 果

140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156

血液供与牛の末梢白血球数 (WBC)は 9, 800/ μ l, BLV プロウイルス量は 722 コピー/10ng DNA, PBMC の BLV 感染率は 96%であった。接種前に qPCR および ELISA により検査を実施し, 全ての羊で BLV プロウイルスおよび抗 BLV 抗体が検出されないことを確認した。

本実験の結果を表 2-3 に示した。感染細胞を含む羊への乳汁接種の影響は加温処理の間で異なった。HTST 無処理の 1 頭の羊(N114)は, 接種後 5 ヶ月にリンパ腫で死亡した。HTST 無処理または LTLT 無処理牛乳を接種された羊では, 接種後 1 週間に 1 頭を除く全てでプロウイルスが検出され, 1 頭は 2 週間で検出された。また、接種後 3 週間でこれらの羊はすべて抗 BLV 抗体陽性を示した。不完全な HTST 処理の 2 頭の羊は, 接種後 3 週間で qPCR 陽性を示し, 接種後 5 週間で抗 BLV 抗体陽性を示した。陰性対照の 1 頭の羊および LTLT 処理を受けた 2 頭の羊, 完全な HTST 処理を受けた 2 頭の羊は, この研究の終了時まで全頭とも BLV および BLV 抗体は陰性のままであった。

考 察

157

158

159 通過型 HTST 装置および実験室規模の清置型 LTLT 装置の両方で、牛乳中の
160 BLV を効果的に不活性化できた。本研究では、完全な HTST および LTLT 処理
161 を受けた乳汁を接種された羊は、試験期間中（17 週間）BLV に感染しなかった
162 だけでなく(表 2-3)、接種後 1 年まで感染の兆候を示さなかった（データ未掲
163 示）。したがって、試験農場におけるオンサイト通過型 HTST 装置は、 5.2×10^6
164 PBMC / L の BLV 汚染牛乳を完全に不活性化できたと考えられる。

165 BLV 重度感染母牛の初乳 1L には、約 10^6 個の BLV 感染白血球が含まれてい
166 る [Kanno et al., 2014]。BLV 感染母牛由来の牛乳に含まれる BLV 感染白血球
167 の数は不明であるが、ある研究では、BLV 感染母牛からの牛乳中の 10^5 細胞当
168 り約 30 copy のプロウイルスが存在することが報告されている [Watanuki et al.,
169 2019]。したがって、乳汁中の体細胞数が 10^5 /ml であると仮定した場合、BLV 感
170 染白血球の数は 3×10^4 /L であると推定され、本試験における処理サンプル中の
171 PBMC の量はこれよりも多いため、農場オンサイト通過型 HTST 装置は、自然
172 感染 BLV の初乳と乳汁中の BLV を完全に不活性化できる可能性が高いことを
173 示唆している。

174 一方、不完全な HTST 処理は、牛乳中の BLV を完全に不活性化することがで
175 きなかった。今回の試験では、 65°C 以上 72°C 未満 15 秒の条件での不活性化は
176 検討しておらず、牛乳中の BLV を確実に不活性化するためには、完全な HTST
177 条件（すなわち、 72°C で 15 秒）を正確に適用する必要があると考えられた。

178 また、本実験でも現在一般的に行われている LTLT の有効性が改めて確認さ
179 れた。大規模な HTST の利用に適さない小規模農場については、これまで通り
180 LTLT の実施を徹底することが適当と考えられた。

181 我が国においては、肉用繁殖牛群よりも乳用牛群に BLV が広がっている
182 [Murakami et al., 2013]。また、酪農場の子牛に自動フィーダーで供給されて
183 いるプール乳汁は、BLV で汚染されることが多いとの報告もある [Dimmock et
184 al., 1991]。こられの国内の現状を考慮すると、本研究の結果は、プールされた
185 初乳または牛乳を使用する農場においては、オンサイト通過型 HTST 装置が、
186 BLV の感染防止において有益である可能性を示唆している。

187 近年、国内で 80 頭以上の牛を飼育する農場では、初乳や牛乳の処理や給餌に、
188 農場オンサイト大型 HTST 機器が徐々に導入され始めている。本研究で検証し
189 た方法は限られた乳汁資源の利用、初乳および代用乳の利用のための費用の節
190 約につながるとともに、農場の省力化に有効であり、BLV 清浄化のためには特
191 に有効な飼養管理方法となることが期待できる。

192

193

小 括

194

195

196 農場オンサイト大型 HTST 装置は、乳汁中の BLV 感染細胞を効果的に不活
197 化できた。少なくとも BLV 感染においては、プール初乳または乳汁を自動哺乳
198 システムで供給する農場における HTST 処理は、集団飼育される子牛を BLV 感
199 染から守ることが可能であると考えられた。したがって、近年、大規模化する酪
200 農場において、人工哺乳装置の前処理として農場オンサイト型 HTST 装置によ
201 り乳汁加温を行うことにより、省力化をはかりながら BLV 清浄化が可能になる
202 ことが期待できる。

203

204

総 括

205

206

207 BLV は、感染細胞を通じて水平および垂直感染する。水平感染は、牛同士の
208 体液を介した接触感染、アブなどの吸血昆虫を介した自然感染、医療機器除角
209 器具などを介した人為感染がある。垂直感染は、周産期の子宮内・産道感染、出
210 生後の初乳と牛乳を介した感染がある。水平感染は対策が取られているが、垂
211 直感染については実態が不明な部分が多く、国内における実態把握と対策の確
212 立が急務である。

213 第一章では母乳感染防除可能な母子分離時期推定のため、初乳または初乳製
214 剤を給与された黒毛和種子牛の BLV 抗体とプロウイルス量の推移について調
215 査した。その結果、子牛の初乳製剤由来の BLV 抗体は 1～3 ヶ月間持続したの
216 に対し、BLV 感染母牛由来の移行抗体は 6 ヶ月間持続することが示された。ま
217 た、BLV 感染母牛からの産子 5 頭のうち 2 頭は子宮内で既に感染がみられ、1
218 頭は乳汁（初乳または常乳）感染の可能性が示された。更に、子宮内感染は BLV
219 感染母牛のプロウイルス量が多くなくとも起こりうること、高いプロウイルス
220 量は乳汁（初乳および常乳）感染に関連している可能性が推察され、早期母子分
221 離プログラムを構築する上で重要な知見が得られた。

222 第二章では、乳汁中の BLV 感染細胞の不活性化可能な農場オンサイトの大型
223 高温短時間加温（HTST）装置の有効性を検討した。その結果、農場での大型
224 HTST 装置は、乳汁中の BLV 感染細胞を効果的に不活化した。近年、大規模牛
225 飼養農場において省力化のために乳汁の自動給餌システムの導入が進められてい
226 る。本成績は、その前処理として HTST 処理を実施することにより、集団飼育
227 する子牛を BLV 感染から保護し、大規模農場で飼養される牛の健康増進が期待

228 される。

229 本研究成果により、BLV 感染母牛から産出される子牛の母子分離時期の指標
230 が示された。また、我が国においてこれから導入が進むであろう人工哺乳シス
231 テムの前処理に農場オンサイト HTST 装置を活用することにより、BLV 清浄化
232 対策がより一層推進されると期待できる。

233

謝 辞

234

235

236 本研究にあたり，ご指導を賜りました岩手大学大学院 獣医学研究科 村上賢
237 二教授に深謝いたします。また，本論文の執筆にあたり，ご指導・ご校閲を賜り
238 ました岩手大学大学院 獣医学研究科 岡田啓司教授，東京農工大学農学研究院
239 動物生命科学部門 吉田敏則准教授，岩手大学大学院 獣医学研究科（農研機構
240 動物衛生研究部門疫学・昆虫媒介感染症グループ グループ長補佐）山本健久
241 客員教授，農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門長（兼国立大学
242 法人岐阜大学大学院連合獣医学研究科）筒井俊之 客員教授に深謝いたします。

243 本研究にご指導・ご協力を頂きました帝京科学大学生命環境学部 彦野弘一
244 准教授，実験に使用した牛および羊の飼養管理を行っていただきました岩手大
245 学農学部 附属寒冷フィールドサイエンスセンター・御明神牧場 平田統一 准教
246 授ならびに職員各位に深謝いたします。

247 学位取得にあたり終始懇切丁寧にご指導・ご鞭撻いただいた兵庫県淡路農業
248 技術センター・畜産部長 生田健太郎博士，兵庫県北部農業技術センター・畜産
249 部長 岩本英治博士，元兵庫県淡路家畜保健衛生所長 清水泰統氏，姫路家畜保
250 健衛生所 中山卓也氏，病性鑑定課長 中条正樹氏に深謝申し上げます。

251 最後に，本研究の達成のために多くのご協力を頂きました兵庫県姫路家畜保
252 健衛生所および淡路家畜保健衛生所の関係諸氏に改めて深謝申し上げます。

253

254

引用文献

- 255
256
- 257 Agresti A, Ponti W, Rocchi M, Meneveri R, Marozzi A, Cavalleri D, Peri E, Poli G and
258 Ginelli E (1993). Use of polymerase chain reaction to diagnose bovine leukemia
259 virus infection in calves at birth. *Am J Vet Res* **54**: 373-378.
- 260 Baumgartener L, Olson C and Onuma M (1976). Effect of pasteurization and heat
261 treatment on bovine leukemia virus. *J Am Vet Med Assoc* **169**: 1189-1191.
- 262 Bruck C, Renonnet N, Portetelle D, Cleuter Y, Mammerickx M, Burny A, Mamoun R,
263 Guillemain B, van der Maaten MJ and Ghysdael J (1984). Biologically active
264 epitopes of bovine leukemia virus glycoprotein gp51: their dependence on protein
265 glycosylation and genetic variability. *Virology* **136**: 20-31.
- 266 Brunner MA, Lein DH and Dubovi EJ (1997). Experiences with the New York State
267 Bovine Leukosis Virus Eradication and Certification Program. *Vet Clin North Am*
268 *Food Anim Pract* **13**: 143-150.
- 269 Choudhury B, Finnegan C, Frossard J-P, Venables C and Steinbach F (2013). Colostrum
270 Replacer and Bovine Leukemia Virus Seropositivity in Calves. *Emerg Infect Dis*
271 **19**: 1027-1028.
- 272 Choudhury B, Finnegan C, Phillips A, Horigan M, Pollard T and Steinbach F (2015).
273 Detection of Bovine Leukaemia Virus Antibodies and Proviral DNA in Colostrum
274 Replacers. *Transbound Emerg Dis* **62**: e60-e61.
- 275 Corredor-Figueroa AP, Salas S, Olaya-Galán NN, Quintero JS, Fajardo Á, Soñora M,
276 Moreno P, Cristina J, Sánchez A, Tobón J, Ortiz D and Gutiérrez MF (2020).
277 Prevalence and molecular epidemiology of bovine leukemia virus in Colombian

278 cattle. *Infect Genet Evol* **80**: 104171.

279 DanieIsson J, 2003. The Swedish eradication and supervision programmes for Enzootic
280 Bovine Leukosis (EBL) and Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR-IPV). , *Farm*
281 *animalreproduction: RetlucIng infectious disease, Jelgava, Latvia.*, pp. p26-27.

282 Deshayes L, Levy D, Parodi AL and Levy JP (1980). Spontaneous immune response of
283 bovine leukemia-virus-infected cattle against five different viral proteins. *Int J*
284 *Cancer* **25**: 503-508.

285 Dimmock C, Chung Y and MacKenzie A (1991). Factors affecting the natural
286 transmission of bovine leukaemia virus infection in Queensland dairy herds. *Aust*
287 *Vet J* **68**: 230-233.

288 Elizondo-Salazar J, Jayarao BM and Heinrichs AJ (2010). Effect of heat treatment of
289 bovine colostrum on bacterial counts, viscosity, and immunoglobulin G
290 concentration. *J Dairy Sci* **93**: 961-967.

291 Erskine RJ, Bartlett PC, Sabo KM and Sordillo LM (2011). Bovine leukemia virus
292 infection in dairy cattle: effect on serological response to immunization against J5
293 *Escherichia coli* bacterin. *Vet Med Int* **2011**.

294 Ferrer JF and Piper CE (1981). Role of colostrum and milk in the natural transmission
295 of the bovine leukemia virus. *Cancer Res* **41**: 4906-4909.

296 Gao A, Mutharia L, Chen S, Rahn K and Odumeru J (2002). Effect of pasteurization on
297 survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. *J Dairy Sci* **85**: 3198-3205.

298 Haghparast A, Tabatabaei Zadeh SE and Mohammadi GR (2012). Prevalence of Bovine
299 Leukemia Virus (BLV) antibodies in bulk tank milk of dairy cattle herds of Mashhad
300 area, North East of Iran. *J Anim Vet Adv* **11**.

301 Hamada R, Metwally S, Polat M, Borjigin L, Ali AO, Abdel-Hady AAA, Mohamed AEA,
302 Wada S and Aida Y (2020). Detection and Molecular Characterization of Bovine
303 Leukemia Virus in Egyptian Dairy Cattle. *Frontiers in Veterinary Science* **7**.
304 Honma T, Onuma M, Suneya M, Mikami T and Izawa H (1980). Cytotoxic antibody in
305 cattle and sheep exposed to bovine leukemia virus. *Arch Virol* **66**: 293-299.
306 Hopkins SG and DiGiacomo RF (1997). Natural transmission of bovine leukemia virus
307 in dairy and beef cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* **13**: 107-128.
308 Hulbert LE and Moisé SJ (2016). Stress, immunity, and the management of calves. *J*
309 *Dairy Sci* **99**: 3199-3216.
310 Johnson R, Kaneene JB and Anderson SM (1987). Bovine leukemia virus: Duration of
311 BLV colostral antibodies in calves from commercial dairy herds. *Prev Vet Med* **4**:
312 371-376.
313 Kanno T, Ishihara R, Hatama S, Oue Y, Edamatsu H, Konno Y, Tachibana S and
314 Murakami K (2014). Effect of freezing treatment on colostrum to prevent the
315 transmission of bovine leukemia virus. *J Vet Med Sci* **76**: 255-257.
316 Kashmiri SV, Mehdi R and Ferrer JF (1983). Detection, purification, and
317 characterization of two species of covalently closed circular proviral DNA
318 molecules of bovine leukemia virus. *J Virol* **45**: 1172-1176.
319 Ketmann R, Burny A, Callebaut I, Droogmans L, Mammerickx M, Willems L and
320 Portetelle D. Bovine leukemia virus. 1994; pp. 39–81. In: *The Retroviridae*, (Levy
321 JA Ed. Plenum Press, NewYork.
322 Kobayashi S, Hidano A, Tsutsui T, Yamamoto T, Hayama Y, Nishida T, Muroga N,
323 Konishi M, Kameyama K and Murakami K (2014). Analysis of risk factors

324 associated with bovine leukemia virus seropositivity within dairy and beef breeding
325 farms in Japan: A nationwide survey. *Res Vet Sci* **96**: 47-53.

326 Kobayashi S, Tsutsui T, Yamamoto T, Hayama Y, Kameyama K-i, Konishi M and
327 Murakami K (2010). Risk factors associated with within-herd transmission of
328 bovine leukemia virus on dairy farms in Japan. *BMC Vet Res* **6**: 1.

329 Kobayashi S, Yamamoto T, Hayama Y, Murak K and Tsutsui T (2016). Descriptive
330 epidemiology of bovine leukemia in Japan. *Journal of Veterinary Emidemiology* **20**:
331 18.

332 Konishi M, Ishizaki H, Kameyama K-I, Murakami K and Yamamoto T (2018). The
333 effectiveness of colostral antibodies for preventing bovine leukemia virus (BLV)
334 infection in vitro. *BMC Vet Res* **14**.

335 LaDronka RM, Ainsworth S, Wilkins MJ, Norby B, Byrem TM and Bartlett PC (2018).
336 Prevalence of bovine leukemia virus antibodies in US dairy cattle. *Vet Med Int* **2018**.

337 Lassauzet M, Johnson W, Thurmond M and Stevens F (1989). Protection of colostral
338 antibodies against bovine leukemia virus infection in calves on a California dairy.
339 *Can J Vet Res* **53**: 424.

340 Lassauzet M, Thurmond M, Johnson W and Holmberg C (1991). Factors associated with
341 in utero or periparturient transmission of bovine leukemia virus in calves on a
342 California dairy. *Can J Vet Res* **55**: 264.

343 Lassauzet ML, Johnson WO, Thurmond MC and Stevens F (1989). Protection of
344 colostral antibodies against bovine leukemia virus infection in calves on a
345 California dairy. *Can J Vet Res* **53**: 424-430.

346 MAFF. Annual statistics of notifiable diseases (in Japanese). 2020,

347 https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi_densen/attach/pdf/kansi_densen-
348 [165.pdf](#)

349 Mekata H, Sekiguchi S, Konnai S, Kirino Y, Honkawa K, Nonaka N, Horii Y and
350 Norimine J (2015). Evaluation of the natural perinatal transmission of bovine
351 leukaemia virus. *Vet Rec* **176**: 254-254.

352 Michishita K, Oohashi H, Minamisawa N, Katou R, Kimura N, Tomioka T, Harada H
353 and Murakami K (2011). Detection of bovine leukaemia virus (BLV) DNA in milk
354 derived from BLV-infected cows in a slaughterhouse (in Japanese, English abstract).
355 *Journal of Veterinary Medicine (Tokyo)* **64**: 815-819.

356 Murakami K, Kobayashi S, Konishi M, Kameyama K-I and Tsutsui T (2013).
357 Nationwide survey of bovine leukemia virus infection among dairy and beef
358 breeding cattle in Japan from 2009-2011. *J Vet Med Sci* **75**: 1123-1126.

359 Murakami K, Kobayashi S, Konishi M, Kameyama K-I, Yamamoto T and Tsutsui T
360 (2011). The recent prevalence of bovine leukemia virus (BLV) infection among
361 Japanese cattle. *Vet Microbiol* **148**: 84-88.

362 Murphy JM, Hagey JV and Chigerwe M (2014). Comparison of serum immunoglobulin
363 G half-life in dairy calves fed colostrum, colostrum replacer or administered with
364 intravenous bovine plasma. *Vet Immunol Immunopathol* **158**: 233-237.

365 Nagy DW, Tyler JW and Kleiboeker SB (2007). Decreased Periparturient Transmission
366 of Bovine Leukosis Virus in Colostrum-Fed Calves. *J Vet Intern Med* **21**: 1104-1107.

367 National Animal Health Monitoring System (1997). High prevalence of BLV in US
368 dairyherds. USDA:APHIS:VS:NAHMS,Ft Collins, CO.: p197.

369 National Animal Health Monitoring System (1999). High prevalence of BLV in US

370 dairyherds. USDA:APHIS:VS:NAHMS,Ft Collins, CO.: p299.

371 Ndou RV, Sejesho F, Dzoma BM, Motsei LE, Nyirenda M and Bakunzi FR (2011). A
372 serosurvey of the prevalence of enzootic bovine leukosis in the Mafikeng area of
373 the North West Province of South Africa. *Journal of Human Ecology* **36**: 53-55.

374 Nuotio L, Rusanen H, Sihvonen L and Neuvonen E (2003). Eradication of enzootic
375 bovine leukosis from Finland. *Prev Vet Med* **59**: 43-49.

376 Ochirkhuu N, Konnai S, Odbileg R, Nishimori A, Okagawa T, Murata S and Ohashi K
377 (2016). Detection of bovine leukemia virus and identification of its genotype in
378 Mongolian cattle. *Arch Virol* **161**: 985-991.

379 Ohshima K-I, Morimoto N, Kagawa Y, Numakunai S, Hirano T and Kayano H (1984).
380 A survey for maternal antibodies to bovine leukemia virus (BLV) in calves born to
381 cows infected with BLV. *The Japanese Journal of Veterinary Science* **46**: 583-586.

382 OIE. Enzootic bovine leukosis. 2018; pp. 1113-1124. In: *Manual of diagnostic tests and*
383 *vaccines for terrestrial animals 2019*, (World Health Organization for Animal
384 Health, Paris.

385 Oliver-Espinosa O, Physick-Sheard PW, Wollenberg GK and Taylor J (1994). Sporadic
386 bovine leukosis associated with ataxia and tibiotarsal joint swelling: a case report.
387 *Can Vet J* **35**: 777.

388 Onuma M, Driscoli DM and Olson C (1977). Location of antigens associated with
389 bovine leukemia virus. *Arch Virol* **55**: 131-137.

390 Ooshiro M, Konnai S, Katagiri Y, Afuso M, Arakaki N, Tsuha O, Murata S and Ohashi
391 K (2013). Horizontal transmission of bovine leukemia virus from lymphocytotic
392 cattle, and beneficial effects of insect vector control. *Vet Rec*: vetrec-2013-101833.

393 Piper CE, Ferrer JF, Abt DA and Marshak RR (1979). Postnatal and prenatal
394 transmission of the bovine leukemia virus under natural conditions. *J Natl Cancer*
395 *Inst* **62**: 165-168.

396 Polat M, Ohno A, Takeshima S-n, Kim J, Kikuya M, Matsumoto Y, Mingala CN, Onuma
397 M and Aida Y (2015). Detection and molecular characterization of bovine leukemia
398 virus in Philippine cattle. *Arch Virol* **160**: 285-296.

399 Rodríguez SM, Florins A, Gillet N, De Brogniez A, Sánchez-Alcaraz MT, Boxus M,
400 Boulanger F, Gutiérrez G, Trono K, Alvarez I, Vagnoni L and Willems L (2011).
401 Preventive and Therapeutic Strategies for Bovine Leukemia Virus: Lessons for
402 HTLV. *Viruses* **3**: 1210-1248.

403 Rubino M and Donham K (1984). Inactivation of bovine leukemia virus-infected
404 lymphocytes in milk. *Am J Vet Res* **45**: 1553-1556.

405 Ruiz V, Porta NG, Lomónaco M, Trono K and Alvarez I (2018). Bovine leukemia virus
406 infection in neonatal calves. Risk factors and control measures. *Frontiers in*
407 *Veterinary Science* **5**: 267.

408 Salman M, Chriél M and Wagner B, 2003. Improvement of survey and sampling
409 methods to document freedom from diseases in Danish cattle population on both
410 national and herd levels., *Enzootic bovine leukosis. Report on International EpiLab*
411 *Project 5, København, pp. 41-43.*

412 Şevik M, Avcı O and İnce ÖB (2015). An 8-year longitudinal sero-epidemiological study
413 of bovine leukaemia virus (BLV) infection in dairy cattle in Turkey and analysis of
414 risk factors associated with BLV seropositivity. *Trop Anim Health Prod* **47**: 715-
415 720.

416 Stoye JP, Blomberg J, Coffin JM, Fan H, Hahn B, Neil J, Quackenbush S, Rethwilm A
417 and Tristem M. Family Retroviridae. 2011; pp. 477-495. In: Virus taxonomy: ninth
418 report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, (King AM,
419 Lefkowitz E, Adams MJ, Carstens EB Eds.) Elsevier, San Diego.

420 Trainin Z, Brenner J, Meirom R and Ungar-Waron H (1996). Detrimental effect of
421 bovine leukemia virus (BLV) on the immunological state of cattle. *Vet Immunol*
422 *Immunopathol* **54**: 293-302.

423 Trono KG, Pérez-Filgueira DM, Duffy S, Borca MV and Carrillo C (2001).
424 Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison
425 of sensitivity and specificity of different detection methods. *Vet Microbiol* **83**: 235-
426 248.

427 Tsutsui T, Kobayashi S, Hayama Y and Yamamoto T (2016). Fraction of bovine leukemia
428 virus-infected dairy cattle developing enzootic bovine leukosis. *Prev Vet Med* **124**:
429 96-101.

430 Van Der Maaten M, Miller J and Schmerr M (1981). Effect of colostral antibody on
431 bovine leukemia virus infection of neonatal calves. *Am J Vet Res* **42**: 1498-1500.

432 VanLeeuwen JA, Tiwari A, Plaizier JC and Whiting TL (2006). Seroprevalences of
433 antibodies against bovine leukemia virus, bovine viral diarrhea virus,
434 *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, and *Neospora caninum* in beef
435 and dairy cattle in Manitoba. *The Canadian Veterinary Journal* **47**: 783.

436 Watanuki S, Takeshima S, Borjigin L, Sato H, Bai L, Murakami H, Sato R, Ishizaki H,
437 Matsumoto Y and Aida Y (2019). Visualizing bovine leukemia virus (BLV)-infected
438 cells and measuring BLV proviral loads in the milk of BLV seropositive dams. *Vet*

439 Res **50**: 102.

440 Yang Y, Fan W, Mao Y, Yang Z, Lu G, Zhang R, Zhang H, Szeto C and Wang C (2016).

441 Bovine leukemia virus infection in cattle of China: Association with reduced milk

442 production and increased somatic cell score. *J Dairy Sci* **99**: 3688-3697.

443 Yoshinaka Y and Oroszlan S (1985). Bovine leukemia virus post-envelope gene coded

444 protein: evidence for expression in natural infection. *Biochem Biophys Res*

445 *Commun* **131**: 347-354.

446 伊藤全 (1987). 牛白血病ウイルス抗体保有状況全国調査. 家畜衛試研究報告

447 **90**: 35~60.

448 松崎駿ら, 2019. アブの牛白血病ウイルス保有率と昆虫忌避剤入りネットの実地

449 効力試験に関する検討, 第 125 回日本畜産学会大会講演要旨集.

450 新宮 博, 甫立 孝, 櫛引 史, 上田 靖, 渡辺 彰 and 松本 光 (2002). Profiles of

451 Milk Yield and Milk Composition in Lactating Japanese Black and Japanese

452 Shorthorn Cows (黒毛和種及び日本短角種の乳量及び乳成分の変化). *Bull*

453 *Natl.Agric.Res.Cent.Tohoku Reg* (東北農業研究センター研究報告): 61-66.

454 東京都芝浦食肉衛生検査所 (2009). 第 3 章検査統計. 35-48.

455 農林水産省消費安全局畜水産安全管理課 (2009). 届出伝染病の発生月報. 家畜

456 衛生週報: 340-342.

457 農林水産省生産局畜産部. 畜産・酪農をめぐる情勢. 2021,

458 https://www.maff.go.jp/j/chikusan/kikaku/lin/l_hosin/attach/pdf/index-48.pdf

459

图 表

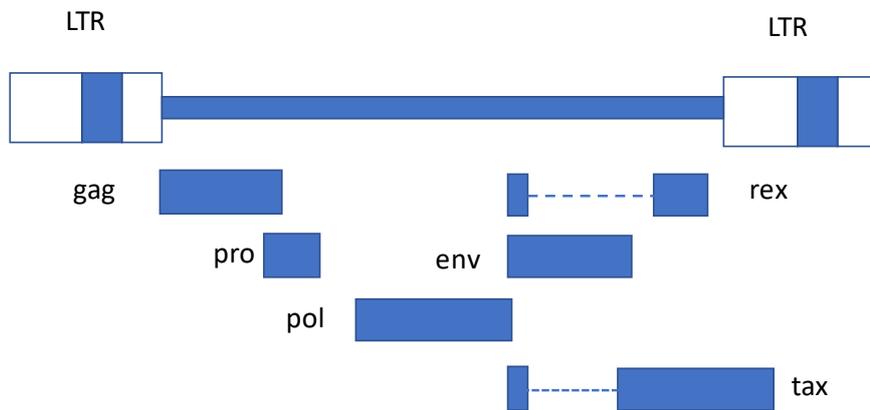


図 0-1 牛白血病ウイルス (BLV) プロウイルスの遺伝子構造

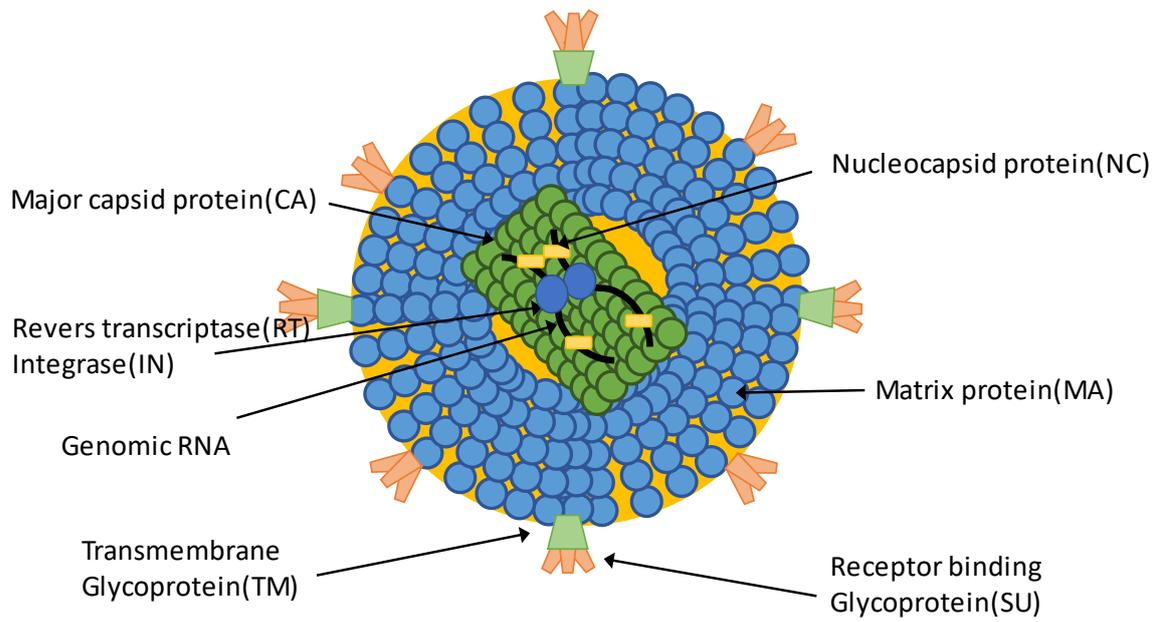


図 0-2 牛白血病ウイルス (BLV) の模式図

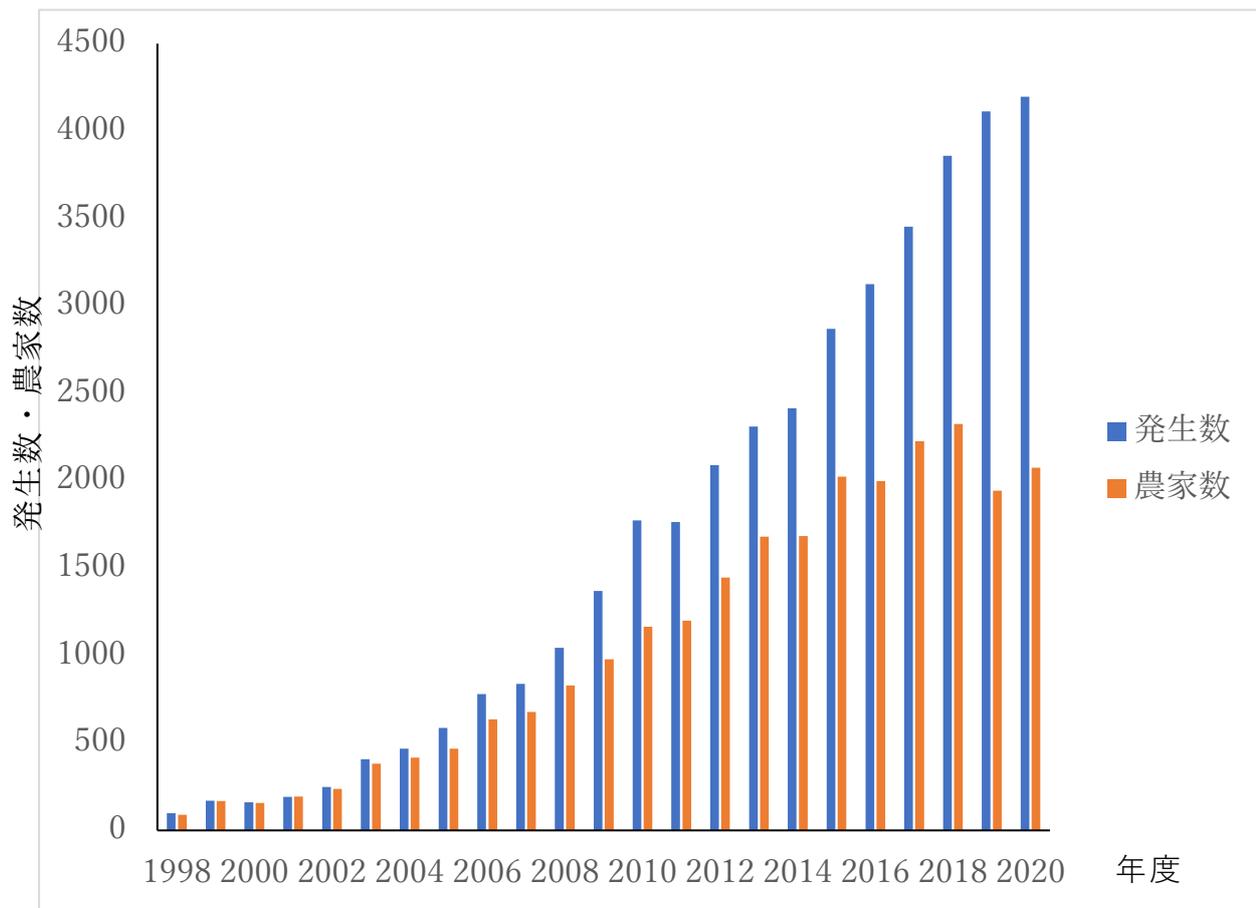


図0-3 我が国における年度別牛伝染性リンパ腫の発生数

表 1-1 牛白血病ウイルス (BLV) の感染経路

感染方式	感染時期	感染経路	対策
垂直感染	周産期	子宮内・産道感染	無し
	哺乳期	初乳・乳汁感染	不活化 (加熱・凍結) 母子分離
水平感染	出生以降	接触感染	隔離飼育
		自然感染 (吸血昆虫など)	昆虫防除・忌避剤
		人為感染 (医療器具など)	1 頭毎交換
		精液感染	フリー種雄牛

表 1-2 乳用牛および肉用牛の哺乳育成型態

品種	初乳中 免疫グロブリン濃度*	母子分離	抗体陽性に関連する要因**
黒毛和種 (肉用牛)	160.1 mg/ml	3～6月齢	外部からの導入
ホルスタイン種 (乳用牛)	73.1 mg/ml	0日齢	プール初乳

*:北海道 畜産試験場 小原

** :H19年度地域別 BLV 浸潤状況 (動物衛生研究所 村上ら)

表 1-3 採材計画

		Stage1	Stage2	Stage3	Stage4	Stage5	Stage6
分娩前後 14 日	日齡	1-14	15-29	30-59	60-79	80-105	165 超
母牛	採血						
子牛		採血	採血	採血	採血	採血	採血
		哺乳（初乳・初乳製剤、牛乳）			離乳（母子分離）		

表 1-4 . 出生後各段階での ELISA と quantitative PCR による牛白血病ウイルス (BLV) 感染状況

Group ¹⁾	母牛		出生後子牛の段階 ²⁾												
	Dam colostrum /colostru m replacer	母牛 No. ELISA/qPCR ³⁾	子 牛 No.	1		2		3		4		5		6	
				ELISA/qPCR ³⁾	日 齢	ELISA/qPCR ³⁾	日 齢	ELISA/qPCR ³⁾	日 齢	ELISA/qPCR ³⁾	日 齢	ELISA/qPCR ³⁾	日 齢 ⁴⁾	ELISA/qPCR ³⁾	日 齢 ⁴⁾
G1	46	-/UD	1	-/NT	14	-/NT	23	-/NT	37	-/UD	79	-/UD	98	-/UD	191
+/-	592	-/UD	2	-/NT	1	-/NT	15	-/NT	31	-/UD	70	-/UD	87	-/UD	178
G2	600	-/UD	3	1(0.81)/UD	7	1(0.81)/UD	16	1(0.52)/UD	30	-/UD	72	-/UD	91	-/UD	184
+/+	735	-/UD	4	16(1.55)/UD	1	16(1.14)/UD	18	1(1.11)/UD	32	1(0.59)/UD	74	1(0.33)/UD	93	-/UD	186
	1124	-/UD	5	16(1.41)/UD	11	16(1.31)/UD	28	4(1.26)/UD	42	1(0.72)/UD	84	1(0.46)/UD	103	-/UD	196
G3	47	256(1.94)/UD	6	256(1.93)/UD	7	256(1.78)/UD	16	64(2.57)/UD	30	16(2.54)/UD	72	16(2.19)/UD	91	1(0.43)/UD	184
+/+	284	16(1.82)/UD	7	64(1.75)/UD	9	16(2.23)/UD	23	16(2.19)/UD	37	16(1.93)/UD	65	16(1.23)/UD	84	-/UD	177
G4	580	64(2.39)/1133	8	64(1.93)/UD	12	64(1.82)/UD	29	16(2.06)/UD	57	16(2.03)/UD	68	4(2.12)/UD	85	64(2.7)/615	176
+/+	233	64(1.91)/103	9	64(2.48)/213	11	64(2.67)/229	25	16(2.56)/156	53	16(2.15)/118	72	64(2.3)/533	86	256(2.78)/514	165
	653	256(2.40)/472	10	256(2.38)/45	3	256(1.93)/707	16	256(1.8)/487	33	64(2.23)/299	72	16(2.64)/214	89	64(3.2)/220	180

-
- 1) G1; ELISA-/qPCR-母牛からの初乳摂取子牛, G2; ELISA-/qPCR-母牛からの初乳と初乳製剤摂取子牛, G3; ELISA+/qPCR-母牛からの初乳と初乳製剤摂取子牛, G4; dams with ELISA+/qPCR+ 母牛からの初乳と初乳製剤摂取子牛.
 - 2) Stage1, stage2, stage3, stage4, stage5, stage6 は, それぞれ 1-14, 15-29, 30-59, 60-79, 80-105, 165 超 日齢.
 - 3) ELISA 陽性はみなし抗体価 (SP 比), 陰性は -, quantitative PCR (qPCR)による BLV proviral load は/10 ng DNA . UD; undetected, NT; not tested.

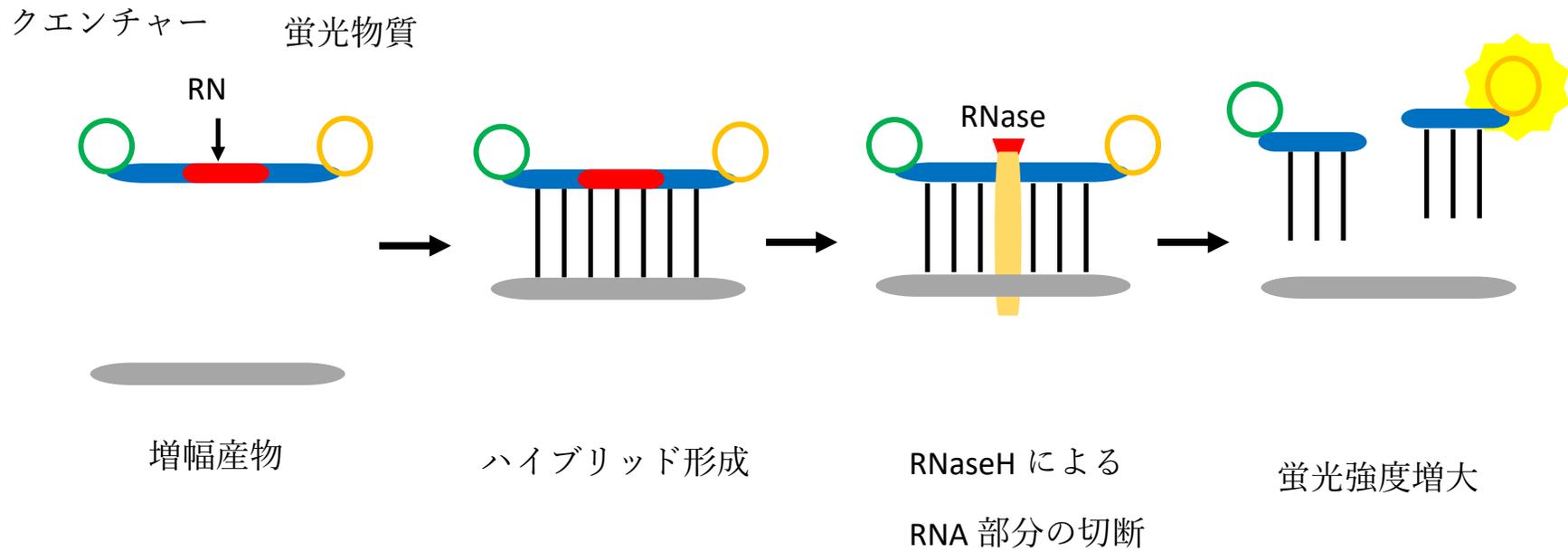


図1-1 サイクリングプローブ法の原理

表 2-1 生乳の殺菌工程について

	殺菌方法	加熱温度	加熱時間
低温殺菌	低温長時間殺菌法 LTLT 法 : Low Temperature Long Time	63~65°C	30 分
	連続式低温殺菌法 LTLT 法 : Low Temperature Long Time	65~68°C	30 分
高温殺菌	高温短時間殺菌法 HTST 法 : High Temperature Short Time	72~75°C	15 秒以上
	高温保持殺菌法 HTLT 法 : High Temperature Long Time	75°C以上	15 秒以上
超高温殺菌	超高温短時間殺菌法 UHT 法 : Ultra High Temperature	120~150°C	1~3 秒
	超高温滅菌殺菌法 LL 法 : Long Life	135~150°C	1~3 秒

表 2-2 採材計画

処理	頭数	月齢	採材
	(品種・性別)		
Complete HTST	2 (Co:雌 2 頭)	8	
incomplete HTST ¹⁾	2 (Co:去勢 1 頭, Su:去勢 1 頭)	5-39	
No HTST	5 (Co:去勢 2 頭, 雌 1 頭, Su:去勢 2 頭)	5-39	接種後 13 回 (0-17 週後) ⁵⁾ 採血
LTLT ²⁾	2 (Co:去勢 1 頭, Su : 去勢 1 頭)	16-42	
No LTLT	4 (Co:去勢 3 頭, Su 去勢 1 頭)	5-38	
陰性 Control ³⁾	1 (Co1)	20	

1) HTST (高温低時間加温 ; 72°C, 15 秒間)。Incomplete HTST (72° C に到達する前に 15 秒間) で加温器を通過させたサンプルを羊に腹腔内接種。

2) LTLT (低温長時間加温 ; 60°C, 30 分) を通過させたサンプルを腹腔内接種。

3) 陰性 Control ; 感染細胞を含まない市販の牛乳を腹腔内接種

4) Co ; コリーデル, Su ; サフオーク

5) 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 13, 15, 17 週後

表 2-3 牛白血病ウイルス (BLV) 感染末梢血単核球 (PBMC) を含む殺菌又は未殺菌牛乳を接種された羊の週毎の qPCR と ELISA 試験

殺菌処理	羊 No.	品種	性別 ¹⁾	月齢	試験	接種後週											BLV 感染		
						0	1	2	3	4	5	6	7	9	11	13		15	17
Complete	G13	コリーデル	F	8	qPCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	無し
					ELISA	-	NT [§]	-	NT	-	NT	-	-	-	-	-	-	-	
HTST	G15	コリーデル	F	8	qPCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	無し
					ELISA	-	NT	-	NT	-	NT	-	-	-	-	-	-	-	
Incomplete	B17.2	サフォーク	C	39	qPCR	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	有り
					ELISA	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
HTST ²⁾	N113	コリーデル	C	5	qPCR	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	有り
					ELISA	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
No HTST	N114	コリーデル	C	5	qPCR	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	有り ⁴⁾
					ELISA	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

B23.3	サフオーク	C	39	qPCR	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	有り
				ELISA	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
B21.2	サフオーク	C	39	qPCR	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	有り
				ELISA	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
G14	コリーデル	C	9	qPCR	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	有り
				ELISA	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
G16	コリーデル	F	8	qPCR	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	有り
				ELISA	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
LTLT	B23.2	サフオーク	C	42	qPCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	無し
					ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
No LTLT	R92.2	コリーデル	C	16	qPCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	無し
					ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
No LTLT	B24	サフオーク	C	38	qPCR	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	有り
					ELISA	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
	R93.2	コリーデル	C	16	qPCR	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	有り

					ELISA	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
					qPCR	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
N115	コリーデル	C	5		ELISA	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	有り
					qPCR	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
N116	コリーデル	C	5		ELISA	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	有り
					qPCR	-	-	-	NT	-	NT	-	-	-	-	-	
-Control ³⁾	B92.3	コリーデル	C	20	ELISA	-	NT	-	NT	-	NT	-	-	-	-	-	無し

1) C; 去勢 F; 雌

2) Incomplete; 72° C に到達する前に 15 秒間加温器を通過したサンプル

3) Control; 感染細胞を含まない牛乳を腹腔内接種

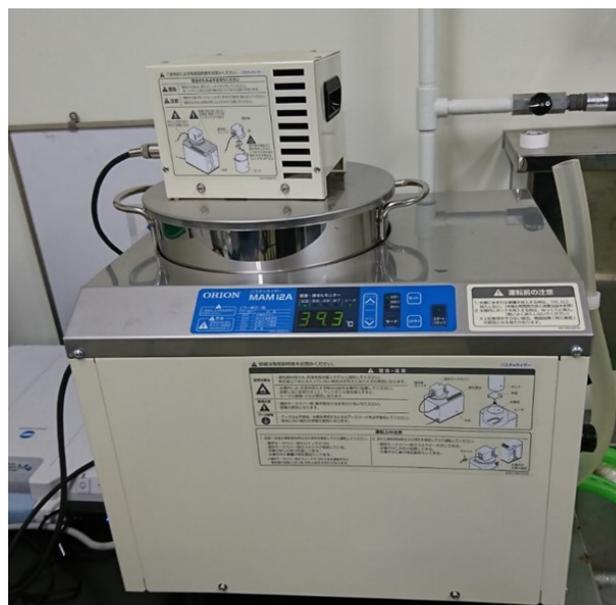
4) 接種後 5 か月でリンパ種発症

NT; not tested.



大型加温器

通過型，乳汁加温量 13 L 以上
加温条件：72°C，13 秒



小型加温器

清置型，乳汁加温量 数 mL~1L
加温条件：60°C，30 分

图 2-1 乳汁加温装置